

EFFECTO DEL EXTRACTO CRUDO Y LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *Heliopsis longipes* SOBRE LA INCIDENCIA DE LA ANTRACNOSIS, MICORRIZACIÓN Y NODULACIÓN DEL FRIJOL

EFFECT OF CRUDE EXTRACT AND BIOACTIVE COMPOUNDS OF *Heliopsis longipes* ON ANTHRACNOSE INCIDENCE, MYCORRHIZATION, AND NODULATION OF BEAN

Rafael Salgado-Garciglia¹, Jorge Molina-Torres², Joel E. López-Meza³ y Pedro D. Loeza-Lara^{4*}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, U.M.S.N.H., Morelia, Michoacán, México. ²Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV-I.P.N., Unidad Irapuato, Guanajuato, México. ³Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología F.M.V.Z., U.M.S.N.H., Morelia, Michoacán, México. ⁴Genómica Alimentaria, Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, Sahuayo, Michoacán, México. (pedrodamian1@lycos.com).

RESUMEN

Para el control de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en invernadero y campo, se evaluó el efecto del extracto crudo (EC) y la mezcla de compuestos bioactivos afinina (A) y decatrién bornilo (DB), obtenidos de la raíz de *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake. También se evaluó el efecto sobre la colonización de la raíz del frijol por hongos micorrízicos vesículo arbusculares (HMVA) y la nodulación de bacterias fijadoras de nitrógeno. En invernadero, dos de las concentraciones del EC (700/70 y 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y A/DB (700/70 y 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), redujeron la incidencia de la antracnosis en 90%, sin reducción significativa ($p > 0.05$) del peso seco de las plantas tratadas. En campo, las concentraciones evaluadas de EC (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), redujeron la incidencia de la antracnosis en 88%, sin efecto significativo sobre el peso seco de las plantas tratadas ($p > 0.05$), lo que confirmó la capacidad de estos compuestos para reducir la enfermedad. La aplicación del EC y la mezcla A/DB en campo no afectó el establecimiento de HMVA y bacterias fijadoras de nitrógeno en las raíces de frijol.

Palabras clave: *Colletotrichum lindemuthianum*, manejo integrado de plagas y enfermedades, metabolitos secundarios, nuevos fungicidas.

INTRODUCCIÓN

La antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), ocasionada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Lams.-Scrib., es la enfermedad más importante de este cultivo en las zonas de temporal en México (Mendoza-Zamora, 1991), y puede ser devastadora cuando las condiciones climáticas favorecen al patógeno (González *et al.*, 1998). Ataca diversas partes de las plantas, particularmente

ABSTRACT

For bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthracnose control under greenhouse and field conditions, the effect of crude extract and the mixture of bioactive afinina (A) compounds and bornyl decatrién (DB) obtained from *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake root was assessed. Besides, the effect on bean root colonization by shrub vesicle mycorrhizal fungi (HMVA) and nodulation of nitrogen-fixing bacteria was evaluated. Two of the EC concentrations (700/70 and 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and A/DB (700/70 and 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), under greenhouse conditions, reduced anthracnose incidence by 90%, without significant reduction ($p > 0.05$) of dry weight of the treated plants. Under field conditions, the evaluated EC concentrations (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduced anthracnose incidence reduction by 88%, without significant effect on dry weight of the treated plants ($p > 0.05$), which confirmed the capacity of these compounds to reduce the disease. Application of EC and A/DB mixture under field conditions did not affect establishment of HMVA and nitrogen-fixing bacteria in bean roots.

Key words: *Colletotrichum lindemuthianum*, integrated pest and disease management, secondary metabolites, new fungicides.

INTRODUCTION

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthracnose caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magnus) Lams.-Scrib., is the most important disease of this crop in the rainfed zones in Mexico (Mendoza-Zamora, 1991) and can be devastating when the pathogen is favored by the climatic conditions (González *et al.*, 1998). It attacks different plant parts, particularly pods, and reduces yield by 20 to 30% (Pastor *et al.*, 1995). In order to control this disease, synthetic fungicides have been used frequently, but their extensive application and without adequate control, has provoked adverse effects in the ecosystem

* Autor responsable.

Recibido: Abril, 2007. Aprobado: Junio, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 679-688. 2008.

vainas y reduce 20 a 30% el rendimiento (Pastor *et al.*, 1995). Para controlar esta enfermedad frecuentemente se usan fungicidas sintéticos, pero su aplicación extensiva y sin control adecuado ha provocado efectos adversos en el ecosistema y en la salud humana, lo que ha inducido la búsqueda de métodos de control alternativos de bajo riesgo (Okigbo y Ogbonnaya, 2006). Los metabolitos secundarios vegetales o compuestos bioactivos con propiedades fungicidas son una opción en el manejo de patógenos que transmiten enfermedades, ya que actúan contra un número limitado de especies, son biodegradables a productos no tóxicos, tienen bajo impacto en la salud humana y se pueden incorporar en programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, por lo que a partir de ellos podrían desarrollarse nuevos agentes de control (Lee *et al.*, 2001; Key *et al.*, 2003).

Las raíces de chilcuague *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake (Asteraceae) se usan como anestésico local, desparasitante y condimento de alimentos (Martínez, 1994); además tienen actividad insecticida (Fisher, 1957) y fungicida (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000). En experimentos *in vitro* se ha mostrado que el extracto crudo (EC) de la raíz de esta planta tiene actividad fungicida contra *C. lindemuthianum*, ya que inhibe su crecimiento micelial y la germinación de sus esporas. Otros estudios (Molina-Torres *et al.*, 1995 y 1996), han revelado la presencia de dos compuestos bioactivos del grupo de las alcanidas, presentes en el EC: afinina (A) y decatrién bornilo (DB) (Figura 1) como responsables de la actividad fungicida contra *C. lindemuthianum*, observándose un efecto fungicida equivalente al EC cuando se mezclan los compuestos puros A y DB (Covián, 1999)⁵.

En experimentos de inhibición de la germinación de esporas se determinó la concentración letal 50 (CL₅₀) del EC, la cual correspondió a una concentración de A de 70 µg mL⁻¹ etanol y una concentración de DB de 7 µg mL⁻¹ etanol. Este resultado fue confirmado mediante la evaluación de la mezcla de compuestos purificados A/DB a una concentración de 70/7 µg mL⁻¹ etanol. La efectividad de la CL₅₀ del EC y la mezcla A/DB para controlar la incidencia de la antracnosis se evaluó en experimentos *in vivo*, en laboratorio, en plantas de frijol inoculadas con esporas de *C. lindemuthianum*, observándose que las plantas tratadas con EC y A/DB no mostraron síntomas de la antracnosis (Covián, 1999)⁵. Sin embargo, se desconoce la efectividad fungicida del EC y la mezcla A/DB en invernadero

and in human health, which has induced the search for alternative low-risk control methods (Okigbo and Ogbonnaya, 2006). Secondary vegetal metabolites or bioactive compounds with fungicide properties are an option in the management of pathogens that transmit diseases, since they act against a limited number of species, are biodegradable to nontoxic products, have low impact on human health, and can be incorporated to integrated pest and disease management programs; that is why from them new control agents could be developed (Lee *et al.*, 2001; Key *et al.*, 2003).

The roots of chilcuague, *Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake (Asteraceae), are used as local anesthetic, parasiticide, and for food seasoning (as spices?) (Martínez, 1994); besides, they possess insecticide (Fisher, 1957) and fungicide activity (Ramírez-Chávez *et al.*, 2000). With *in vitro* experiments it has been shown that the crude extract (EC) of the root of this plant has fungicide activity against *C. lindemuthianum*, since it inhibits its mycelial growth and spore germination. Other studies (Molina-Torres *et al.*, 1995 and 1996), revealed the presence of two bioactive compounds of the alkamide group in EC: Afinina (A) and bornyl decatrién (DB) (Figure 1) as responsible for fungicide activity against *C. lindemuthianum*, a fungicidal effect, equivalent to that of EC, being observed when the pure A and DB compounds are mixed (Covián, 1999)⁵.

In experiments of spore germination inhibition, lethal concentration 50 (CL₅₀) of EC was determined, corresponding to an ethanol concentration of A of 70 µg mL⁻¹ and an ethanol concentration of DB of 7 µg mL⁻¹. This result was confirmed through the assessment of the mixture of A/DB compounds, purified to a concentration of 70/7 µg mL⁻¹ ethanol. The effectiveness of CL₅₀ of EC and the A/DB mixture for controlling anthracnose incidence was assessed under laboratory conditions in experiments *in vivo* on bean plants inoculated with *C. lindemuthianum* spores, observing that the plants treated with EC and A/DB did not show symptoms of anthracnose (Covián, 1999)⁵. Nevertheless, fungicidal effectiveness of EC and A/DB mixture under greenhouse and field conditions is unknown, and thus, the control of bean anthracnose incidence. Likewise, information about the effect of said compounds on symbiotic organisms of bean root has not been found; for example, shrub vesicle mycorrhizal fungi (HMVA) and nitrogen-fixing bacteria.

⁵ Covián, N.F. 1999. Evaluación del efecto del extracto de chilcuague (*Heliopsis longipes*) sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 62 p.

y campo y, por tanto, el control de la incidencia de la antracnosis del frijol. Así mismo, no se encontró información del efecto de dichos compuestos sobre organismos simbiotes de la raíz del frijol; por ejemplo, hongos micorrízicos vesículo arbusculares (HMVA) y bacterias fijadoras de nitrógeno.

Por tanto, los objetivos de este estudio fueron evaluar el efecto del EC y la mezcla A/DB, en la incidencia de la antracnosis del frijol en invernadero y campo, así como de los compuestos bioactivos sobre las asociaciones simbióticas nativas establecidas en la raíz del frijol por HMVA y bacterias fijadoras de nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se hizo en el invernadero del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), en Morelia, Michoacán, México. Los experimentos en campo se realizaron en una parcela experimental ubicada en Tiripetío, Morelia, Michoacán, México.

Material vegetal

Las raíces de *H. longipes* se obtuvieron de plantas en etapa de floración del mercado local del municipio Doctor Mora, al noroeste del Estado de Guanajuato, México. Un espécimen fue identificado en el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH, por la Botánica Luz del Socorro Rodríguez. Para los ensayos en invernadero y campo se usaron semillas de frijol (*P. vulgaris* cv. Flor de Mayo).

Obtención de esporas de *C. lindemuthianum*

Se usó una cepa patógena de *C. lindemuthianum* correspondiente a la cepa a (donada por la Dra. June Simpson del Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV Unidad-Irapuato). El hongo se mantuvo creciendo 8 d en medio YEB (extracto de levadura 1 g L⁻¹; sulfato de magnesio 0.1 g L⁻¹; sacarosa 5 g L⁻¹; peptona de caseína 5 g L⁻¹; peptona de carne 5 g L⁻¹; agar bacteriológico 10 g L⁻¹, suplementado con vainas de frijol) a 30 °C. Luego, las esporas de *C. lindemuthianum* se recolectaron en agua destilada estéril y se cuantificaron en un hematocitómetro (Pastor *et al.*, 1995). Se preparó un inóculo a 1 × 10⁶ esporas mL⁻¹ en agua destilada estéril, utilizado para inocular plantas de frijol mediante aspersión en los experimentos de invernadero y campo.

Obtención del EC y los compuestos A, DB

El EC se obtuvo pulverizando 10 g de material seco de la raíz, extraído por reflujo continuo durante 3 h en un sistema Soxhlet, con 65 mL de acetato de etilo (Merck®) a 70 °C. El EC fue secado a 45 °C en un rotavapor (Brinkmann/Büchi) y se disolvió en 10 mL de etanol absoluto (Merck®), almacenándose a 4 °C en oscuridad (Molina-Torres *et al.*, 1996). La purificación de los compuestos bioactivos A

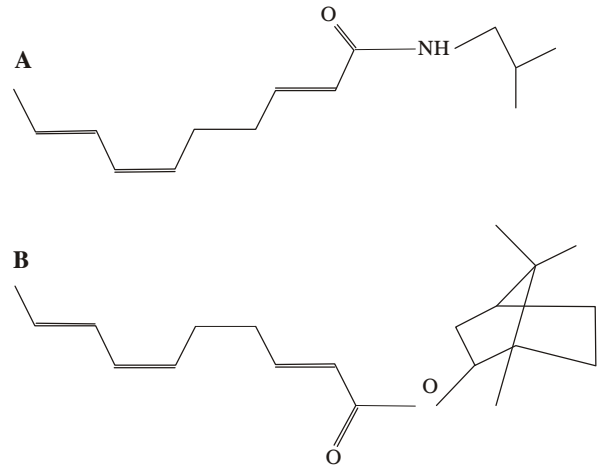


Figura 1. Estructura de los principales compuestos bioactivos en el extracto crudo de la raíz de chilcague (*Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake). A) Afinina *N*-isobutil 2*E*, 6*Z*, 8*E* decatrieno amida. B) Decatrieno bornilo Deca-2*E*, 6*Z*, 8*E* ácido trienoico bornil éster (Molina-Torres *et al.*, 1995 y 1996).

Figure 1. Structure of the principal bioactive compounds in crude extract of chilcague root (*Heliopsis longipes* 'A. Gray' Blake). A) Afinina *N*-isobutyl 2*E*, 6*Z*, 8*E* amida decatrién. B) Bornyl Decatrién Deca-2*E*, 6*Z*, 8*E* trienoic acid bornyl ester (Molina-Torres *et al.*, 1995 and 1996).

Therefore, the objectives of this study were to evaluate the effect of EC and A/DB mixture on bean anthracnose incidence in greenhouse and field, as well as that of bioactive compounds on native symbiotic associations established in bean root by HMVA and nitrogen-fixing bacteria.

MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in the greenhouse of the Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (Biochemical Research Institute) of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), in Morelia, Michoacán, México. The field experiments were carried out in an experimental plot located in Tiripetío, Morelia, Michoacán, Mexico.

Plant material

The *H. longipes* roots were obtained from plants at flowering stage at the local market of the municipality Doctor Mora, northwest of the State of Guanajuato, Mexico. A specimen was identified in the herbarium of the Facultad de Biología of the UMSNH by the botanist Luz del Socorro Rodríguez. For the assays in greenhouse and field, bean seeds (*P. vulgaris* cv. Flor de Mayo) were utilized.

y DB se realizó a partir del EC (Molina-Torres *et al.*, 1995 y 1996), mediante cromatografía en columna utilizando gel de sílice (Sigma®) como fase estacionaria y una mezcla de n-hexano/acetato de etilo (2:1 v/v) (Merck®) como fase móvil.

Experimentos en invernadero y campo

Semillas de frijol, previamente desinfectadas con detergente extrán neutro (Merck®) (5%), etanol (70%), hipoclorito de sodio (Cloralex®) (10%) y agua destilada estéril, se sembraron en macetas de 1 L con agrolita estéril y se mantuvieron en hidroponía, con riegos cada 4 d con la solución nutritiva (0.35 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0.118 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0.5 g L⁻¹ MgSO₄; 0.25 g L⁻¹ KNO₃; 0.20 g L⁻¹ CaCl₂). Se usó un diseño experimental completamente al azar con ocho tratamientos y cinco repeticiones (dos plantas por repetición); haciendo tres inoculaciones del hongo patógeno sobre las plantas de frijol a 15, 30 y 50 d después de la siembra (DDS). Para facilitar el desarrollo de la antracnosis, las plantas se mantuvieron en cámaras húmedas 7 d después de cada inoculación (Pastor *et al.*, 1995).

Para aplicar los compuestos bioactivos, diversos vehículos se evaluaron de acuerdo con su capacidad de disolución, su efecto sobre la germinación de esporas de *C. lindemuthianum* y el daño visible a las plantas de frijol. La mezcla de etanol (50%) (Merck®) y Tween 20 (1%) (Sigma®), mostró los mejores resultados para obtener la disolución adecuada de los compuestos, sin efecto sobre *C. lindemuthianum* y sin daño visible a las plantas de frijol. Según la relación de la concentración del EC y la mezcla A/DB con la inhibición de la germinación del 50% de las esporas de *C. lindemuthianum* documentada por Covián (1999)⁵, se seleccionaron las siguientes concentraciones de compuestos: 700/70, 70/7 y 7/0.7 µg mL⁻¹ etanol (50%)-Tween 20 (1%), las cuales fueron aplicadas en invernadero como EC y una mezcla de compuestos purificados A/DB. Los seis tratamientos se aplicaron tres veces durante el experimento, después de cada inoculación del hongo en la etapa de plántula, desarrollo vegetativo y floración, que corresponden a los 15, 30 y 50 DDS. Como testigo regional se aplicó tiabendazol (TECTO 60®, polvo humectable, 600 g i. a. kg⁻¹, MSD AGVET) 5 mg mL⁻¹ agua y se usó un testigo sin tratar (S/T), para el cual se usaron plantas inoculadas con esporas de *C. lindemuthianum* sin aplicar ningún tratamiento fungicida, sólo los vehículos de aspersión, etanol (50%)-Tween 20 (1%).

La evaluación de los compuestos sobre la incidencia de la antracnosis se realizó a los 7, 20 y 45 d después de la primera inoculación (DDPI), con base en la escala visual de síntomas de Schoonhoven y Pastor (1987). Se contaron las plantas enfermas, y para el análisis estadístico estos datos fueron transformados a: $\sqrt{x+0.5}$ (Steel y Torrie, 1980), y la incidencia se expresó como el porcentaje de plantas enfermas (Amadioha, 2000) con la fórmula: Incidencia = número de plantas enfermas/número total de plantas X 100. El peso seco de las plantas tratadas se determinó a los 60 DDPI.

El experimento en campo se hizo en una parcela experimental de 14×8 m y un área de 2 m² para cada tratamiento y se mantuvo

Obtaining *C. lindemuthianum* spores

A pathogenous *C. lindemuthianum* stock was used, corresponding to stock a (donated by Dra. June Simpson del Departamento de Ingeniería Genética del CINESTAV Unidad- Irapuato). The fungus was kept growing for 8 d in YEB medium (1g L⁻¹ yeast extract; 0.1g L⁻¹ magnesium sulfate; 5g L⁻¹ saccharose; 5g L⁻¹ casein peptone; 5g L⁻¹ meat peptone; 10g L⁻¹ bacteriological agar, supplemented with bean pods) at 30 °C. Afterwards, the *C. lindemuthianum* spores were gathered in sterile distilled water and quantified in a hemacytometer (Pastor *et al.*, 1995). An inoculum at 1×10⁶ spores mL⁻¹ was prepared in sterile distilled water, used to inoculate bean plants by spraying in greenhouse and field experiments.

Obtaining EC and A, DB compounds

EC was obtained pulverizing 10g of dry root material extracted by continuous flow during 3 h in a Soxhlet system with 65 mL of (Merck®) ethyl acetate at 70 °C. EC was dried at 45 °C in a (Brinkmann/Büchi) vapor rotation system, and dissolved in 10 mL absolute (Merck®) ethanol, being stored at 4 °C in the dark (Molina-Torres *et al.*, 1996). Purification of the bioactive compounds A and DB was carried out from EC (Molina-Torres *et al.*, 1995 and 1996), through chromatography in column, utilizing (Sigma®) silica gel as stationary phase and a mixture of n-hexane/ethyl acetate (2:1 v/v) (Merck®) as mobile phase.

Greenhouse and field experiments

Bean seeds previously disinfected with 5% (Merck®) neutral extrán detergent, 70% ethanol, 10% sodium hypochlorite (Cloralex®), and sterile distilled water were sown in 1L-pots with sterile agrolite and kept in hydroponics, being irrigated every 4 d with nutritious solution (0.35g L⁻¹ KH₂PO₄; 0.118g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0.5g L⁻¹ MgSO₄; 0.25g L⁻¹ KNO₃; 0.20g L⁻¹ CaCl₂). A completely randomized experimental design with eight treatments and five replications (2 plants per replication) was used; conducting three inoculations of the pathogen fungus on the bean plants at 15, 30, and 50 d after sowing (DDS). In order to facilitate anthracnose development the plants were kept in moist chambers 7 d after each inoculation (Pastor *et al.*, 1995).

To apply the bioactive compounds, different media were assessed according to their dissolving capacity, their effect on *C. lindemuthianum* spore germination, and visible damage to bean plants. The mixture of (50%) (Merck®) ethanol and (1%) (Sigma®) Tween 20, showed the best results to obtain the adequate solution of the compounds, without effect on *C. lindemuthianum* and without visible damage to the bean plants. According to the relationship of EC concentration and A/DB mixture with germination inhibition of 50% of the *C. lindemuthianum* spores, documented by Covián (1999)⁵, the following compound concentrations were selected: 700/70, 70/7; and /0.7 µg mL⁻¹ ethanol (50%)-Tween 20 (1%), which were applied under greenhouse conditions like EC and a mixture of

en condiciones de temporal durante la temporada de lluvias del 2001, en un diseño de bloques completos al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Las tres inoculaciones del hongo en las plantas de frijol y las tres aplicaciones de la concentración efectiva de EC y A/DB, así como del testigo regional y el testigo S/T, se realizaron a 15, 30 y 50 DDS. Se incluyó un testigo absoluto (plantas sin ningún tratamiento y sin inoculación), para evaluar el efecto de los compuestos en la colonización de HMVA y la nodulación de la raíz del frijol. La evaluación de los compuestos en la incidencia de la antracnosis en campo, y la determinación del peso seco de las plantas tratadas se realizó igual que en invernadero. Para evaluar el efecto del EC y la mezcla A/DB en la colonización de HMVA y la nodulación del frijol, se seleccionaron al azar 5 plantas por tratamiento a 15, 35 y 50 días después de la primera aplicación (DDPA), determinándose los porcentajes de colonización de los HMVA (Phillips y Hayman, 1970) y el número promedio de nódulos efectivos (los de color rojizo) (Samaniego-Russo *et al.*, 1996).

Análisis estadístico

Los datos de plantas enfermas se transformaron con la función $\sqrt{x+0.5}$, y la incidencia se expresó como porcentajes de plantas enfermas (Steel y Torrie, 1980; Amadioha, 2000). Se realizó un análisis de varianza ($p \leq 0.05$) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa SPSS para Windows (9.0).

RESULTADOS

Control de la incidencia de la antracnosis en invernadero

La aparición de la antracnosis en las plantas de frijol fue gradual desde 7 hasta 45 DDPI, con una incidencia máxima (100% de plantas enfermas) 45 DDPI en el testigo S/T. Los tratamientos con EC ($7/0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) y A/DB ($7/0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), mostraron 50% de incidencia de enfermedad. Los tratamientos que controlaron significativamente la incidencia de la antracnosis ($p \leq 0.05$) fueron TECTO 60, EC ($700/70$ y $70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$) y A/DB ($700/70$ y $70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$), con incidencias de 0 a 10% de plantas enfermas, a los 45 DDPI (Cuadro 1).

El testigo S/T, el EC ($7/0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la mezcla A/DB ($7/0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), tuvieron promedios de peso seco, 60 DDPI, de 3, 4.75 y 4.91 g, los cuales fueron diferentes del resto de los tratamientos ($p \leq 0.05$). Los tratamientos con mayores promedios de peso seco fueron TECTO 60, EC ($700/70$ y $70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$) y A/DB ($700/70$ y $70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$), con promedios de peso seco de 11.00, 10.79, 9.64, 10.21 y 10.13 g, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) (Cuadro 1).

purified A/DB compounds. The six treatments were applied three times during the experiment, after each fungus inoculation at the stage of seedling, vegetative development, and flowering, which correspond to 15, 30, and 50 DDS. As regional control, thiabendazole (TECTO 60®, moisturizable (humidifying?) powder, 600g i. a. kg^{-1} , MSD AGVET) was applied, using 5mg mL^{-1} water and an untreated control (S/T), for which plants inoculated with *C. lindemuthianum* spores were utilized, to which not any fungicidal treatment was applied, only ethanol (50%) – Tween 20 (1%) spray (media?).

Evaluation of compounds on anthracnose incidence was carried out at 7, 20, and 45 d after the first inoculation (DDPI), based on Schoonhoven and Pastor's (1987) visual scale of symptoms. Diseased plants were counted, and for statistical analysis these data were transformed to: $\sqrt{x+0.5}$ (Steel and Torrie, 1980); the incidence was expressed as percentage of diseased plants (Amadioha, 2000) by the formula: Incidence = number of diseased plants / total number of plants X 100. Dry weight of the treated plants was determined at 60 DDPI.

The field experiment was carried out in an experimental plot of $14 \times 8 \text{ m}$ and an area of 2 m^2 for each treatment and was kept under rainfed conditions during the rainy season of the year 2001, in a design of complete randomized blocks with five treatments and four replications. The three fungus inoculations on the bean plants and the three applications of effective EC and A/DB concentration as well as the regional and the S/T control, were made at 15, 30, and 50 DDS. An absolute control was included (plants without any treatment and without inoculation) in order to assess the effect of the compounds on HMVA colonization and the nodulation of bean root. The assessment of compounds on incidence of anthracnose in field and determining of dry weight of treated plants were conducted the same as in greenhouse. In order to evaluate the effect of EC and A/DB mixture on HMVA colonization and nodulation of bean, 5 plants were randomly selected by treatment at 15, 35, and 50 days after the first application (DDPA); the percentages of HMVA colonization (Phillips and Hayman, 1970) and the mean number of effective nodules (those of reddish color) (Samaniego-Russo *et al.*, 1996) being determined.

Statistical analysis

The data of diseased plants were transformed with the function $\sqrt{x+0.5}$, and incidence was expressed as percentages of diseased plants (Steel and Torrie, 1980; Amadioha, 2000). An analysis of variance was conducted ($p \leq 0.05$) and a Tukey test ($p \leq 0.05$) using SPSS program for Windows (9.0).

RESULTS

Anthracnose incidence control under greenhouse conditions

Anthracnose in bean plants appeared gradually from 7 up to 45 DDPI, with maximum incidence (100% of diseased plants) 45 DDPI in the S/T control. The treatments with EC ($7/0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$) and A/DB ($7/0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), showed 50% of disease incidence. The

Cuadro 1. Porcentaje de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. con antracnosis y su peso seco en invernadero. Morelia, Michoacán, México.
Table 1. Percentage of *Phaseolus vulgaris* L. plants with anthracnose and their dry weight in greenhouse Morelia, Michoacán, México

Tratamientos	Plantas enfermas (%)			Peso seco (g)
	7 DDPI [†]	20 DDPI	45 DDPI	
EC, 700/70 µg mL ⁻¹	0 [‡] a	10 a	10 a	10.79 a
EC, 70/7 µg mL ⁻¹	0 a	10 a	10 a	9.64 a
EC, 7/0.7 µg mL ⁻¹	10 a	40 c	50 c	4.75 b
A/DB, 700/70 µg mL ⁻¹	0 a	10 a	10 a	10.21 a
A/DB, 70/7 µg mL ⁻¹	0 a	10 a	10 a	10.13 a
A/DB, 7/0.7 µg mL ⁻¹	10 a	50 c	50 c	4.91 b
TECTO 60, 5 mg mL ⁻¹	0 a	0 a	0 a	11.0 a
S/T	20 b	80 d	100 d	3.0 b

[†] Días después de la primera inoculación.

[‡] Los datos fueron transformados a: $\sqrt{x+0.5}$ y representan el porcentaje de plantas enfermas (Steel y Torrie, 1980; Amadioha, 2000).

a, b, c, d: Valores con letra diferente en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

Control de la incidencia de la antracnosis en campo y efecto del EC y la mezcla A/DB en la colonización de HMVA y la nodulación de las raíces del frijol

La aparición de los síntomas de antracnosis en campo se observó a partir de los 20 DDPI, con una incidencia máxima en el testigo S/T (100% de plantas enfermas) a los 45 DDPI. Los tratamientos que controlaron significativamente la incidencia de la antracnosis ($p \leq 0.05$) fueron TECTO 60, EC (70/7 µg mL⁻¹) y A/DB (70/7 µg mL⁻¹), con 0, 12 y 12% de plantas enfermas, a 45 DDPI (Cuadro 2).

El testigo S/T tuvo el promedio de peso seco (3.3 g) más bajo a 60 DDPI, mientras que los tratamientos con mayores promedios de peso seco fueron TECTO 60, EC (70/7 µg mL⁻¹) y A/DB (70/7 µg mL⁻¹), con promedios de peso seco de 8.49, 7.87 y 7.89 g, sin diferencias significativas ($p > 0.05$) entre estos tres tratamientos (Cuadro 2).

Los tratamientos TECTO 60, EC (70/7 µg mL⁻¹), A/DB (70/7 µg mL⁻¹) el testigo absoluto mostraron,

treatments significantly controlling anthracnose incidence ($p \leq 0.05$) were TECTO 60, EC (700/70 and 70/7 µg mL⁻¹) and A/DB (700/70 and 70/7 µg mL⁻¹) with incidence of 0 to 10 % diseased plants at 45 DDPI (Table 1).

The S/T control, EC (7/0.7 µg mL⁻¹), and the mixture A/DB (7/0.7 µg mL⁻¹) had dry weight means, 60 DDPI, of 3, 4, 75, and 4.91g, which were unlike the rest of the treatments ($p \leq 0.05$). The treatments with higher dry weight means were TECTO 60, EC (700/70 and 70/7 µg mL⁻¹), and A/DB (700/70 and 70/7 µg mL⁻¹) with dry weight means of 11.00, 10.79, 9.64, 10.21, and 10.13 g, without significant differences ($p > 0.05$) (Table 1).

Anthracnose incidence control under field conditions and effect of EC and A/DB mixture on HMVA colonization and nodulation of bean roots

Appearance of anthracnose symptoms under field conditions was observed from 20 DDPI, with maximum

Cuadro 2. Porcentaje de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. enfermas de antracnosis y su peso seco en campo. Tiripetío, Morelia, Michoacán, México.

Table 2. Percentage of *Phaseolus vulgaris* L. plants diseased with anthracnose and their dry weight under field conditions. Tiripetío, Morelia, Michoacán, México

Tratamientos	Plantas enfermas (%)			Peso seco (g)
	7 DDPI [†]	20 DDPI	45 DDPI	
EC, 70/7 µg mL ⁻¹	0 [‡] a	0 a	12 a	7.87 a
A/DB, 70/7 µg mL ⁻¹	0 a	0 a	12 a	7.89 a
TECTO 60, 5 mg mL ⁻¹	0 a	0 a	0 a	8.49 a
S/T	0 a	20 b	100 c	3.3 b

[†] Días después de la primera inoculación.

[‡] Los datos fueron transformados a: $\sqrt{x+0.5}$ y representan el porcentaje de plantas enfermas (Steel y Torrie, 1980; Amadioha, 2000).

a, b, c: Valores con letra diferente en cada columna son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

50 DDPa, porcentajes de colonización de HMVA de 66, 66, 67 y 67%, sin diferencias estadísticas entre tratamientos. Los tratamientos TECTO 60, EC (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y el testigo, presentaron 14, 15, 14 y 14 nódulos efectivos, 50 DDPa, sin diferencias entre tratamientos (Cuadro 3).

DISCUSIÓN

Concentraciones de 700/70 y 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del EC y de la mezcla A/DB, disminuyeron la incidencia de la antracnosis en 90% en invernadero, sin reducción significativa del peso seco de las plantas tratadas. Esto coincide con lo reportado por Covián (1999)⁵ de que el EC y A/DB son efectivos en condiciones controladas a partir de una concentración ³70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de EC y A/DB evaluada en campo fue efectiva por reducir la incidencia de antracnosis en 88%, sin reducción significativa del peso seco de las plantas tratadas, lo que muestra la efectividad de ambas preparaciones para reducir la densidad de inóculo del hongo; evitando el establecimiento de la enfermedad en invernadero y en campo (Goes *et al.*, 2008). La falta de protección suficiente proporcionada por los tratamientos EC (7/0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), A/DB (7/0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y testigo S/T, favoreció la infección del patógeno y el desarrollo de los síntomas, como observaron Hidalgo y Araya (1993).

La reducción de la incidencia de la antracnosis en 90 y 88% en invernadero y campo muestra aspectos interesantes. La concentración de 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de EC y A/DB, mostró un efecto protector similar en condiciones controladas y no controladas; pero es importante señalar que se requirieron tres aplicaciones en condiciones no controladas de este tratamiento para controlar la antracnosis, lo que podría explicar el mismo nivel de protección en ambas condiciones. Además, la presencia de un pequeño porcentaje de plantas enfermas (10 % en invernadero y 12% en campo) que aún

incidence in S/T control (100% diseased plants at 45 DDPI). The treatments which significantly controlled anthracnose incidence ($p \leq 0.05$) were TECTO 60, EC (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) with 0, 12, and 12% diseased plants at 45 DDPI (Table 2).

The S/T control had the lowest mean dry weight (3.3 g) at 60 DDPI, while the treatments with the highest mean dry weight were TECTO 60, EC (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), with dry weight means of 8.49, 7.87, and 7.89 g, without differences among these three treatments (Table 2).

The treatments TECTO 60, EC (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the absolute control, at 50 DDPI, showed percentages of HMVA colonization of 66, 66, 67 and 67% of colonization, without statistical differences among treatments. The treatments TECTO 60, EC (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), A/DB (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the absolute control had 14, 15, 14 and 14 effective nodules, 50 DDPa, without differences among treatments (Table 3).

DISCUSSION

Concentrations of 700/70 and 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of EC and the A/DB mixture diminished anthracnose incidence by 90% under greenhouse conditions, without significant reduction of dry weight in the treated plants. This result agrees with that reported by Covián (1999)⁵, stating that EC and A/DB are effective under controlled conditions from a concentration of ³70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The concentration (70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of EC and A/DB evaluated in field was effective reducing anthracnose incidence by 88% without significant reduction of dry weight of the treated plants, which demonstrates the effectiveness of both preparations to reduce inoculum density of the fungus, avoiding the establishment of the disease in greenhouse and in field (Goes *et al.*, 2008). The lack of sufficient protection provided by the EC (7/0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and A/DB (7/0.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Cuadro 3. Porcentaje de colonización de HMVA y número de nódulos efectivos de la raíz de *Phaseolus vulgaris* L. en campo. Tiripetío, Morelia, Michoacán, México.

Table 3. Percentage of HMVA colonization and number of effective nodules of *Phaseolus vulgaris* L. root under field conditions. Tiripetío, Morelia, Michoacán, México.

Tratamientos	Colonización de HMVA (%) 50 DDPa [†]	Nódulos de bacterias fijadoras de nitrógeno 50 DDPa [‡]
EC, 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$	66	14
A/DB, 70/7 $\mu\text{g mL}^{-1}$	65	14
TECTO 60, 5 mg mL ⁻¹	66	15
Testigo absoluto	67	14

[†] Días después de la primera aplicación.

[‡] Promedio de nódulos efectivos por planta.

Sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$).

tienen esporas activas de *C. lindemuthianum*, indica que la enfermedad persistirá, aunque a niveles mínimos, como observaron Hidalgo y Araya (1993). Sin embargo, la presencia de estas esporas es importante, ya que no se pretende eliminar al patógeno, sino disminuir la densidad del inóculo a un nivel que no cause daño significativo al cultivo, conservando la calidad del ambiente (Badii *et al.*, 1996).

Otro resultado importante es que la concentración efectiva del EC y A/DB ($70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$), es menor que la reportada para numerosos fungicidas sintéticos usados para controlar la antracnosis; por ejemplo, tiabendazol 5 mg mL^{-1} (TECTO 60®, polvo humectable, $600 \text{ g i. a. kg}^{-1}$, MSD AGVET) o sulfato de cobre 40 mg mL^{-1} (sulfato de cobre pentahidratado, cristales solubles en agua, $250 \text{ g i. a. kg}^{-1}$, Sulcona S.A. de C.V.). Esto es importante desde el punto de vista económico y de contaminación ambiental, ya que los compuestos químicos son más caros, causan mayor daño a la salud humana y son más agresivos con el ambiente y su fauna benéfica debido a sus concentraciones elevadas, alta persistencia y toxicidad (Silva-Flores *et al.*, 2005).

El efecto de numerosos plaguicidas en organismos no blanco ha sido bien documentado (Cox, 2006). El fungicida Captan (CAPTAN® 50 WP, polvo humectable, $500 \text{ g i. a. kg}^{-1}$, ZENECA) es ejemplo de un plaguicida inespecífico, debido a su efecto inhibitorio en el crecimiento de HMVA inoculados en la raíz de fresa (Ferrera *et al.*, 1998). El efecto nulo de la concentración efectiva del EC y A/DB en la colonización de HMVA y la nodulación de las raíces del frijol en campo es importante, ya que su efecto específico en agentes patógenos causales de enfermedades es una característica que deben poseer los compuestos bioactivos para ser incluidos dentro de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (Gullino *et al.*, 2000).

En esta investigación se muestra el potencial del EC y la mezcla A/DB obtenidos de la raíz de *H. longipes* para controlar la antracnosis en el cultivo de frijol en invernadero y campo. Estos compuestos pueden proteger al frijol al mismo nivel que el fungicida sintético evaluado, TECTO 60®. En programas de manejo integrado de plagas y enfermedades, los compuestos de *H. longipes* pueden disminuir la densidad de inóculo del hongo impidiendo el desarrollo de la enfermedad. El presente reporte es el primero que muestra la efectividad del EC y la mezcla A/DB, para controlar la incidencia de la antracnosis del frijol en invernadero y campo.

CONCLUSIONES

El EC y la mezcla de compuestos purificados A/DB, reducen la incidencia de la antracnosis del frijol en

treatments and the S/T control favored pathogen infection and symptom development, as observed by Hidalgo and Araya (1993).

The reduction of anthracnose incidence by 90 and 88% under greenhouse and field conditions has interesting aspects. Concentration of $70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$ of EC and A/DB showed a similar protective effect in controlled and uncontrolled conditions; but it is important to point out that three applications were required in uncontrolled conditions of this treatment to control anthracnose, which could explain the same protection level in both conditions. Besides, the presence of a small percentage of diseased plants (10% in greenhouse and 12% in field), that still have active spores of *C. lindemuthianum*, indicates that the disease will persist, though at minimum levels, as Hidalgo and Araya observed (1993). Nevertheless, the presence of these spores is important, since it is not pretended to eliminate the pathogen, but to diminish inoculum density to a level that would not cause significant damage to the crop, conserving the quality of the environment (Badii *et al.*, 1996).

Another important result is that the effective concentration of EC and A/DB ($70/7 \mu\text{g mL}^{-1}$) is lower than that reported for numerous synthetic fungicides utilized for anthracnose control, for example, thiabendazole 5 mg mL^{-1} (TECTO 60®, moisturizing powder, $600 \text{ g i. a. kg}^{-1}$, MSD AGVET) or copper sulfate 40 mg mL^{-1} (pentahydrated copper sulfate, water-soluble crystals, $250 \text{ g i. a. kg}^{-1}$, Sulcona S.A. de C.V.). This is important from the economical point of view and considering environmental contamination, since chemical compounds are more expensive, cause greater damage to human health, and are more aggressive with respect to environment and its benign fauna, due to their high concentrations, persistence and toxicity (Silva-Flores *et al.*, 2005).

The effect of numerous pesticides on nontarget organisms has been well-documented (Cox, 2006). Captan fungicide (CAPTAN® 50 WP, moisturizing powder, $500 \text{ g i. a. kg}^{-1}$, Zeneca) is an example of an unspecific pesticide, due to its inhibiting effect on HMVA growth, inoculated on strawberry root (Ferrera *et al.*, 1998). The null effect of EC and A/DB effective concentration on HMVA colonization and bean root nodulation under field conditions is important, since its specific effect on disease-causing pathogenic agents is a characteristic that bioactive compounds must possess to be included in the integrated pest and disease management programs (Gullino *et al.*, 2000).

In this research, the potential of EC and A/DB mixture, obtained from *H. longipes* root to control anthracnose in bean crop under greenhouse and field conditions is demonstrated. These compounds can

invernadero y campo al mismo nivel que el fungicida regional evaluado. Las plantas sometidas a la aplicación de los tratamientos no mostraron síntomas de fitotoxicidad, lo que se confirmó en el peso seco de las plantas tratadas. La aplicación de estos compuestos en campo no tuvo efecto sobre la colonización de las raíces de frijol por HMVA y la nodulación por bacterias fijadoras de nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH por el apoyo financiero otorgado al proyecto 2.10-RSG/CIC-UMSNH, P.D.L.L., recibió beca del CONACYT y la UMSNH.

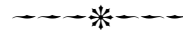
LITERATURA CITADA

- Amadioha, A. C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection* 19: 287-290.
- Badii M., H., A. Flores E., R. Foroughbakhch, H. Quiroz, y R. Torres. 1996. Ecología del Manejo Integrado de Plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. *In: Avances recientes en la Biotecnología de Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. pp: 40-47.
- Cox, C. 2006. Ten reasons not to use pesticides. *J. Pest. Reform.* 26: 10-12.
- Ferrera C., R., C. González CH., y J. Pérez M. 1998. Biotecnología de la micorriza arbuscular en fruticultura. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp: 62-66.
- Fisher, T. R. 1957. Taxonomy of the genus *Heliopsis* (Compositae). *Ohio J. Sci.* 57: 171-191.
- Goes, A., R. B. O. Garrido, R. F. Reis, R. B. Baldassari, and M. A. Soares. 2008. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. *Crop Protection* 27: 71-76.
- González, M., R. Rodríguez, M. E. Zavala, J. L. Jacobo, F. Hernández, J. Acosta, O. Martínez, and J. Simpson. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88: 292-299.
- Gullino, M. L., P. Leroux, and C. M. Smith. 2000. Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection* 19: 1-11.
- Hidalgo R., y C. M. Araya. 1993. Estado de crecimiento óptimo del frijol común para el combate químico de antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y mancha angular (*Isariopsis griseola*) en San Carlos, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 17: 75-80.
- Key, K. M., C. G. Ja, and L. H. Seon. 2003. Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in a greenhouse. *J. Agric. Food. Chem.* 51: 1578-1581.
- Lee, S. E., J. E. Kim, and H. S. Lee. 2001. Insecticide resistance in increasing interest. *Agric. Chem. Biotechnol.* 44: 105-112.
- Martínez, M. 1994. Las Plantas Medicinales de México. Botas (eds). 6ª edición. México. pp: 113-115.
- Mendoza-Zamora, C. 1991. Diagnóstico de enfermedades fungosas. Boletín. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp: 15-76.
- protect bean at the same level as the assessed synthetic fungicide, TECTO 60®. In integrated pest and disease management programs, the compounds of *H. longipes* can diminish inoculum density of the fungus, preventing disease development. The present report is the first one to prove the effectiveness of EC and A/DB mixture to control anthracnose incidence in bean under greenhouse and field conditions.

CONCLUSIONS

EC and the mixture of purified A/DB compounds reduce anthracnose incidence of bean under greenhouse and field conditions at the same level as the evaluated regional fungicide. The plants submitted to the application of the treatments did not show symptoms of phyto-toxicity, which was confirmed in the dry weight of the treated plants. The application of these compounds under field conditions did not have effect on bean root colonization by HMVA and nodulation by nitrogen-fixing bacteria.

End of the English version—



- Molina-Torres, J., R. Salgado-Garciglia, E. Ramírez-Chávez, and R. E. Del-Río. 1995. Presence of the bornyl ester of deca-2E, 6Z, 8E-trienoic acid in *Heliopsis longipes* roots. *J. Nat. Prod.* 58: 1590-1591.
- Molina-Torres, J., R. Salgado-Garciglia, E. Ramírez-Chávez, and R. E. Del-Río. 1996. Purely olefinic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 24: 43-47.
- Okigbo, R. N., and U. O. Ogbonnaya. 2006. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. *African J. Biotechnol.* 5: 727-731.
- Pastor, C. M., M. Otoy, A. Molina, and S. Singh. 1995. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Middle America and Andean South America in different common bean races. *Plant Dis.* 79: 63-67.
- Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Ramírez-Chávez, E., L. Lucas-Valdez, G. Virgen-Calleros, y J. Molina-Torres. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia* 34: 207-215.
- Samaniego-Russo, R., A. Larqué-Saavedra, y R. Ferrera-Cerrato. 1996. El trasplante de frijol inoculado con *Rhizobium* como estrategia para incrementar la fijación biológica de nitrógeno en condiciones de secano. *Agrociencia* 30: 345-351.
- Schoonhoven A., y M. Pastor A. 1987. Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. 56 p.
- Silva-Flores, M. A., J. C. Rodríguez-Maciel, O. Díaz-Gómez, y N. Bautista-Martínez. 2005. Efectividad biológica de un derivado de ácido graso para el control de *Macrosiphum rosae* L.

(HOMOPTERA: APHIDIDAE) y *Tetranychus urticae* Koch
(ACARI: TETRANICHYDAE). Agrocienia 39: 319-325.

Steel R., G., y J. Torrie H. 1980. Bioestadística: Principios y Procedimientos. McGraw-Hill (eds.). 2ª Edición. pp: 226-227.